

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/11, C07K 14/37, A61K 38/16, G01N 33/569</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/27005</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 6. September 1996 (06.09.96)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/AT96/00038 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 1. März 1996 (01.03.96)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> A 379/95                      2. März 1995 (02.03.95)                      AT  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT MBH [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ACHATZ, Gernot [AT/AT]; Schiessstattstrasse 7/III/7, A-5020 Salzburg (AT). OBERKOFER, Hannes [AT/AT]; A-5732 Mühlbach 98 (AT). SIMON, Birgit [AT/AT]; Dirnböckweg 17, A-8700 Leoben (AT). UNGER, Andrea [AT/AT]; Zaisberg 14, A-5201 Seekirchen (AT). LECHENAUER, Erich [AT/AT]; Dörtlstrasse 16, A-5400 Hallein (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Montigasse 1, A-1170 Wien (AT). BREITEN- BACH, Michael [AT/AT]; Alfred Kubinstrasse 11/11, A-5020 Salzburg (AT).  <b>(74) Anwälte:</b> CASATI, Wilhelm usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu          veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> RECOMBINANT DNA MOLECULES THAT CODE FOR POLYPEPTIDES WITH ANTIGENIC PROPERTIES OF ALLERGENS CLAH8 AND CLAH12  <b>(54) Bezeichnung:</b> REKOMBINANTE DNA MOLEKÜLE, DIE FÜR POLYPEPTIDE KODIEREN, DIE DIE ANTIGENITÄT DER ALLERGENE CLAH8 UND CLAH12 BESITZEN  <b>(57) Abstract</b>  The complete cDNA sequences of Cladosporium herbarum allergens Clah8 and Clah12 are disclosed. The molecular biological analysis of said allergens identified Clah12 (recognised by 22 % of all patients) as a ribosomal protein P1. This protein is of interest in that auto-antibodies against ribosomal proteins can be found in Lupus patients, but a link between mould allergies and autoimmune diseases must still be demonstrated. Clah8 (recognised by 9 % of all patients) is highly homologous to a family of transcription factors characterised by a so-called cold shock domain. With this recombinant sequence, highly potent B- and T-cell epitopes could be determined by computer analysis. The peptides derived from the recombinant protein could be used for diagnosing a Cladosporium herbarum mould allergy. In addition, the peptides could be used for stimulating T-cells (promoting their proliferation and interleukin production) in vitro and in vivo in response to specific allergens, but also for blocking T-cells that cause tolerance of allergen-specific T-lymphocytes.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung bezieht sich auf die vollständigen cDNA-Sequenzen der Cladosporium herbarum Allergene Clah8 und Clah12. Im Rahmen der molekularbiologischen Analyse der Allergene konnte Clah12 (wird von 22 % der Patienten erkannt) als ribosomales Protein P1 identifiziert werden. Dieses Protein ist insofern interessant, weil in Lupus Patienten Autoantikörper gegen ribosomale Proteine zu finden sind. Ob zwischen Schimmelpilzallergie und Autoimmunkrankheiten ein Zusammenhang besteht, muß erst gezeigt werden. Clah8 (wird von 9 % der Patienten erkannt) weist eine hohe Homologie zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren auf, die durch eine sogenannte cold-shock Domäne gekennzeichnet sind. Mit Hilfe dieser rekombinanten Sequenz konnten mit Computeranalyse hoch potente B- und T-Zellepitope bestimmt werden. Die von den rekombinanten Proteinen abgeleiteten Peptide könnten für die Diagnose einer Cladosporium herbarum Schimmelpilzallergie verwendet werden. Im weiteren könnten die Peptide für eine in vitro aber auch in vivo allergenspezifische Stimulation von T-Zellen (Proliferation, Interleukinproduktion) eingesetzt werden, oder aber auch zu einer Blockierung von T-Zellen, die zu einer Toleranz der allergenspezifischen T-Lymphozyten führen.		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Rekombinante DNA Moleküle, die für Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene Clah8 und Clah12 besitzen

### 1. Gegenstand der Erfindung

5 Die vorgelegte Patentanmeldung beinhaltet die vollständigen cDNA Sequenzen Clah8 und Clah12 von Cladosporium herbarum, sowie die von diesen Primärsequenzen abgeleiteten Peptidsequenzen, die bei Pilzallergikern zu einer pathologischen Immunantwort mit einem Überschießen von IgE-Antikörpern führen. Rekombinante Allergene, bzw. immunogen wirkende Teilpeptide, können neben einer verbesserten  
10 Diagnostik auch zu einer in vivo oder in vitro Induktion einer Immuntoleranz bzw. Anergie von T-Lymphozyten Verwendung finden.

### 2. Theoretischer Hintergrund der Erfindung

Immunologische Mechanismen, die zur Abwehr von Antigenen aus der Umwelt im Laufe der Evolution etabliert wurden, können normalerweise zwischen Selbst und  
15 nicht-Selbst unterscheiden. Wie es jedoch bei komplexen Kontrollmechanismen oft der Fall ist, unterliegt auch das Immunsystem einer gewissen Fehlerhäufigkeit und bei Versagen erfolgt ein Angriff auf eigenes Gewebe. Es gibt 4 prinzipielle Situationen, in denen der Körper von seinem eigenen Immunsystem angegriffen wird. Die Situationen unterscheiden sich in der Herkunft der Antigene, die den Angriff auslö-  
20 sen, und in dessen Mechanismus und deren Manifestation. Die Antwort kann durch Umweltantigene, durch ein infektiöses Agens (aber auch durch harmlose Substanzen), durch Gewebsantigene, die von einer anderen Person stammen, und durch Antigene des Individuums selbst ausgelöst werden. Die Reaktion bezeichnet man als "allergisch".

25 Ein prinzipielles Merkmal bei Allergien ist, daß eine applizierte Substanz statt einer Protektion eine erhöhte Sensibilität oder Hypersensibilität induziert. Einige dieser Substanzen sind Toxine, andere harmlose Proteine.

Heute unterscheidet man 4 Typen der Hypersensibilität: Typ I-IV. Typ I-III werden durch Antikörper vermittelt, während Typ IV durch T-Lymphozyten vermit-  
30 telt wird.

Die Typ I Hypersensibilität wird auch als Hypersensibilität vom Soforttyp bezeichnet, weil ihre Wirkung innerhalb von Stunden nach Antigenkontakt auftritt. In der initialen Sensibilisierungsphase dieses Mechanismus gelangt Antigen (Allergen) in den Körper, wird von antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und 5 prozessiert. Das prozessierte Antigen wird anschließend zusammen mit MHC II an der Oberfläche der APC den T-Helferzellen (Th) präsentiert. Die Th produzieren Lymphokine, die den B-Lymphozyten helfen, zu antikörper-produzierenden Plasmazellen zu differenzieren. Die B-Lymphozyten erkennen das Allergen über ihre Oberflächenrezeptoren und sezernieren IgE. Sie binden an Rezeptoren von Mastzellen 10 und Basophilen. Die initiale Bindung hat jedoch keinen offensichtlichen Effekt auf die Zellen.

Wenn jedoch das Allergen erneut in den Körper kommt beginnen die Schwierigkeiten. Das multivalente Allergen bindet an IgE und über andere Epitope an weitere IgE-Moleküle, so daß es zu einer Brückenbildung (Kreuzvernetzung) zwischen 15 den IgE-Molekülen kommt. Die Aggregation immobilisiert den Rezeptor und induziert eine Signaltransduktionskette, die schließlich zur Degranulation der Mastzellen führt. Die Degranulation führt zur Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen. Die freigesetzten Substanzen sind vor allem Histamin und Heparin. Histamin stimuliert glatte Muskelzellen, Gefäßendothelzellen und Nervenendigungen. Heparin 20 übt eine inhibitorische Wirkung auf Thrombozyten aus. Die allergische Antwort wird sowohl in der Akut- als auch in der Spätphase vom Nervensystem beeinflusst. Die Neurotransmitter interagieren mit den korrespondierenden Rezeptoren auf den Effektorzellen und aktivieren diese entweder über cAMP oder über cGMP. Die Zielzellen der Neurotransmitter sind wiederum die Mastzellen, die glatte Muskulatur 25 und die epithelialen und sekretorischen Zellen.

### **Natur des Defektes**

Nicht alle Personen, die dem Allergen ausgesetzt sind, entwickeln eine Allergie. Wieso? Man denkt, daß die primäre Ursache des allergischen Zustandes ein Defekt im Immunsystem ist.

30

Die neo- und postnatalen Serum-Immunglobulin-spiegel, besonders IgA, sind sehr niedrig. Allergiker haben oft weniger T-Lymphozyten (CD8+). Viele Allergiker hatten bei der Geburt einen erhöhten IgE-Spiegel. Ihre Basophilen degranulieren leichter. Manche haben auch einen Defekt in den Suppressor-T-Zellen (Ts). Der 5 IgE-Spiegel steigt wenn Ts abnimmt.

Ein starkes Argument gegen einen immunologischen Defekt liegt darin, daß der asthmatische Zustand auch oft ohne Beteiligung des Allergens ausgelöst werden kann. Die Befürworter argumentieren, daß die primäre Ursache der Allergien eher physiologisch als immunologisch ist. Vielleicht sind die Nervenendigungen in der 10 glatten Muskulatur, den sekretorischen Drüsen und den Blutgefäßen der Zielorgane bei allergische Patienten genetisch hyperaktiv.

#### Anaphylaxie

Sie wird durch charakteristische Veränderungen nach einer Zweitexposition mit dem gleichen Antigen ausgelöst. Die für eine Sensibilisierung erforderliche Antigen- 15 menge schwankt erheblich. Eine zu geringe Dosis bewirkt keine Antwort, eine zu große Dosis kann hingegen in einer Protektion statt in einer Sensibilisierung enden. Ein desensibilisierter Zustand kann erzeugt werden, wenn man einen Schock-Zustand überstanden hat. Der Spiegel von reaktivem IgE kehrt aber nach wenigen Wochen wieder zurück.

#### 20 Behandlung allergischer Erkrankungen

Die beste Behandlung ist die Allergenvermeidung. Da die Allergenvermeidung ja kaum hundertprozentig zu erreichen ist, liegen weitere Möglichkeiten im Einsatz von Antihistaminika. Probiert wird heute auch eine sogenannte Immuntherapie. Dabei wird eine Unfähigkeit auf spezifische Allergene zu antworten induziert. Zu 25 diesem Zweck wird der Patient wiederholt mit einer Allergenmixture immunisiert. Man beginnt mit niedrigen Dosen und erhöht langsam, bis der Patient nicht mehr darauf reagiert. Erfolge erzielt man mit der Immuntherapie bei Heuschnupfen, Insektenstichen und allergischem Asthma. Die Behandlung scheint eine Form der partiellen immunologischen Toleranz zu induzieren. Die Desensibilisierung des 30 Patienten ist aber niemals absolut.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist jedoch weder die Diagnose noch die Therapie von allergischen Erkrankungen zufriedenstellend. Die molekulare Charakterisierung der Hauptallergene von *Cladosporium herbarum* mittels cDNA-Klonierung, Sequenzierung, Sequenzvergleich des allergenen Proteins mit Proteindatenbanken, sowie die  
5 Produktion von rekombinanten Allergenen wird mehr Aufschluß über die in vivo Funktion der Proteine geben, die die falschen Immunreaktionen auslösen. Diese Informationen sind aus folgenden Gründen interessant:

- 1) Hochreine rekombinante Allergene können für eine sorgfältigere Diagnose, besser als es heute mit Rohextrakten möglich ist, herangezogen werden.
- 10 2) Die Sequenz der Allergene wird dabei helfen, tolerogene Peptide zu definieren und eventuell auch den "IgE-Class-switch", der bei der Immunisierung mit dem Allergen passiert, verstehen zu lernen.

Seit Jahrzehnten werden IgE-bedingte Allergien, so z.B. auch Allergien gegen Pilzsporen, durch Hyposensibilisierung therapiert (Bousquet et al. 1991). Diese  
15 Therapie besteht in der Zufuhr von Allergenextrakten, in Form von Injektionen oder peroraler Applikation in wässriger Form als Tropfen in steigender Dosierung, bis eine Erhaltungsdosis über mehrere Jahre erreicht ist. Resultat dieser Therapie ist das Erreichen einer Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen, was sich in einer Abnahme der Krankheitssymptome äußert (Birkner et al. 1990). Das Problem bei  
20 dieser Art der Behandlung liegt in der Vielzahl der dadurch auftretenden Nebenwirkungen. Bei der Hyposensibilisierungstherapie sind Fälle von anaphylaktischem Schock während der Behandlung aufgetreten. Das Problem hierbei liegt in der schweren Standardisierbarkeit der Pilzprotein-Isolate. Bei einem Einsatz von Allergen-abgeleiteten, aber nicht anaphylaktisch-wirkenden Peptiden, könnten risikolos  
25 höhere Dosen verabreicht werden und damit eine wesentliche Verbesserung der Hyposensibilisierung erreicht werden.

Aus der Literatur weiß man heute, daß *Cladosporium herbarum* (bzw. die Sporen von *Cladosporium herbarum*), mit wenigen Ausnahmen, der am häufigsten vorkommende Pilz in der Luft ist (Gravesen 1979). Die sehr trockenen Sporen von  
30 *Cladosporium herbarum* können durch den Wind relativ leicht vertragen werden. In

belasteten Zeiten ist es nicht selten, daß man an die 35000 Konidien pro m<sup>3</sup> Luft findet. Durch die leichte Verschleppung der Sporen ist an solchen Spitzentagen auch in geschlossenen Räumen eine erhöhte Sporenbelastung meßbar. Die Hauptbelastungszeit liegt zwischen Frühling und Frühherbst. Diese hohe Konidienzahlen lassen sich damit erklären, daß *Cladosporium herbarum* wegen seiner "genügsamen" Lebensweise nahezu überall zu finden ist. Bevorzugte Lebensräume sind jedoch absterbende Pflanzen, verschiedene Bodentypen, aber auch diverseste Genußmitteln. Nicht gereinigte Kühlschränke, Fensterrahmen, Strohdächer und verschiedene Textilien gehören zu den weiteren Stand- bzw. Lebensorten dieses Pilzes.

- 10 Aus diesen Gründen (ein Kontakt mit *Cladosporium herbarum* Sporen kann praktisch niemals gänzlich ausgeschlossen werden) ist es nicht verwunderlich, daß *Cladosporium herbarum* zum Gegenstand intensiver Forschung auf dem Allergiesektor geworden ist. Heute liegen epidemiologische Studien praktisch nur aus dem Ausland vor. So zeigen z.B. in Finnland 8% von asthmatischen Kindern positive
- 15 Reaktion auf *Cladosporium*-Kontakt (Foucard et al. 1984.).

Die Beschreibung der allergenen Proteine von *Cladosporium herbarum* erfolgte mittels CIE/CRIE und anderen Techniken. Die vermutete Zahl von *Cladosporium herbarum* Antigenen liegt bei ca. 60 (Aukrust 1979, 1980). Das in der Literatur beschriebene Hauptallergen, ClalI 1 wurde aus Rohextrakten aufgereinigt. Das

20 Molekulargewicht liegt bei etwa 13kD. Klonierungen von diversen *Cladosporium herbarum* Allergenen sind bereits (Achatz et al. 1994) vorgenommen worden. Der Vorteil von gentechnologisch hergestellten allergenen Proteinen bzw. deren Teilpeptiden (Voraussetzung dafür ist jedoch eine immunologisch vergleichbare Reaktivität - konnte bei *Betula verucosa* (Ferreira et al. 1993) und anderen Allergenen schon ge-

25 zeigt werden) liegt:

- a) In der Verbesserung der Testsysteme wie RIA (Radioimmunoassay), IRMA (Immunradiometrischer Assay), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay), LIA (luminescence immunoassay), Immunblots, Histamine-release-assay, T-Zell Proliferationsassay und viele mehr.

b) Verbesserung der Hyposensibilisierungstherapie: Diese Therapie besteht in der Zufuhr von Allergenextrakten, in Form von Injektionen oder peroraler Applikation in wässriger Form als Tropfen in steigender Dosierung, bis eine Erhaltungsdosis über mehrere Jahre erreicht ist. Resultat dieser Therapie ist das Erreichen einer Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen, was sich in einer Abnahme der Krankheitssymptome äußert (Birkner et al. 1990). Das Problem bei dieser Art der Behandlung liegt in der Vielzahl der dadurch auftretenden Nebenwirkungen. Bei der Hyposensibilisierungstherapie sind Fälle von anaphylaktischem Schock während der Behandlung aufgetreten. Das Problem hierbei liegt in der schweren Standardisierbarkeit der Pilzprotein-Isolate. Bei einem Einsatz von einem Allergen abgeleitet, aber nicht anaphylaktisch wirkenden Peptiden, könnten risikolos höhere Dosen verabreicht werden und damit eine wesentliche Verbesserung der Hyposensibilisierung erreicht werden.

c) Mit diesen Untersuchungen können aber auch spezifische T- und B-Zell-Epitope definiert werden. Solche Peptide besitzen die Fähigkeit zB. T-Lymphozyten zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen, aber die Zellen (bei genau definierter Dosis) auch in einen Zustand der Toleranz bzw. Nicht-Reaktivität (Anergie) zu versetzen (Rothbard et al. 1991).

### 3. Methoden und Ergebnisse

a) Beschreibung der allergenen Proteine von *Cladosporium herbarum* mittels Western-Blotting

Für die Klonierung der vorliegenden Allergene von *Cladosporium herbarum* standen 128 Patientensera zur Verfügung. Um die Reaktivität der Patienten mit Pilzproteinextrakt zu testen, wurde *Cladosporium herbarum* (Sammlung Prof. Windisch, Berlin, Nummer: 28-0203) auf festem Medium (2% Glukose, 2% Pepton, 1% Hefeextrakt) gezüchtet. Für die Proteinextraktion wurde die Pilzmatte nach 5 Tagen Wachstum bei 23°C abgezogen und mit flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die Auftrennung der extrahierten Proteine erfolgte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel, das anschließend geblottet, mit Patientenserum inkubiert und mit

30



<sup>125</sup>I-markiertem anti human IgE detektiert wurde. In Prozentzahlen ausgedrückt reagierten die Patienten auf die allergenen Proteine wie folgt:

Clah8..... 9%

Clah12..... 22%

- 5 Wie aus diesen Zahlen ersichtlich ist, handelt es sich bei beiden hier beschriebenen Allergenen um Nebenallergene.

b) Konstruktion der cDNA Expressionsbank

Gesamt RNA wurde nach der sauren Guanidium-Phenol-Extraktionsmethode aus selbst gezüchtetem Pilzmaterial gewonnen. poly(A)<sup>+</sup> Anreicherung erfolgte mit 10 Oligo(dT) Cellulose der Firma Böhlinger. Die cDNA Synthese (1. und 2. Strang) wurde durchgeführt, wie im Manual des Lambda ZAP-Systems der Firma Stratagene beschrieben. Die cDNA wurde anschließend (3'-seitig) mit EcoRI und (5'-seitig) mit XhoI Linkern versehen, in vorverdaute Lambda-ZAP-Arme ligiert und verpackt. Der Titer der Primärbank betrug 900000 Klone.

- 15 c) Screening der cDNA Genbank mit Patientensera, in vivo Excision, Sequenzierung

Das Screenen der Expressionsbank erfolgte mittels Inkubation der "gelifteten" Phagenplaques mit dem Serum eines Patienten, von dem man durch das Westernblotting wußte, daß er das Spektrum der detektierten Antigene abdeckt. Die Detektion 20 erfolgte wieder mit anti human IgE RAST Antikörpern der Firma Pharmacia. Nach Sekundär- und Tertiärscreening blieben 7 positive Klone übrig. Sie konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Je ein Klon aus der entsprechenden Gruppe wurde nach der Sangermethode (Sanger 1977) sequenziert.

d) Expression der Clah8 und Clah12 cDNAs als  $\beta$ -Galak-tosidasefusionsprotein

- 25 Die jeweiligen rekombinanten Plasmide wurden in den E.coli Stamm XL1-Blue transformiert und mit IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert. Der E.coli Gesamtproteinextrakt wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose gebロットet. Das Fusionsprotein wurde mittels Serum IgE von Pilzallergikern und einem jodmarkiertem Kaninchen anti human IgE Antikörper (Phar- 30 macia, Uppsala Schweden) detektiert.

Der  $\beta$ -Galaktosidaseanteil des Fusionsproteins beträgt 36 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 3800 Dalton gleichkommt. Unter Berücksichtigung dieser "Vergrößerung" zeigt sich genau, daß die rekombinanten Fusionsproteine von Clah8 und Clah 12 ebenfalls IgE-Bindung zeigen.

5 e) Bestimmung von B- und T-Zell Epitopen bei den rekombinanten Allergenen

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Allergene bietet die Voraussetzung für die Vorhersage von B- und T-Zellepitopen mittels geeigneter Computerprogramme. Mit diesen Untersuchungen können spezifische T- und B-Zell-Epitope definiert werden, die die Fähigkeit besitzen, zB. T-Lymphozyten zu stimulieren und zur Prolife-  
10 ration anzuregen, aber die Zellen (bei genau definierter Dosis) auch in einen Zustand der Toleranz bzw. Nicht-Reaktivität (Anergie) zu versetzen (Rothbard et al. 1991). Die bestimmten Epitope werden jeweils bei der Beschreibung des rekombinanten Proteins in eigenen Figuren angeführt.

Die Suche nach B-Zellepitopen wurde mit Hilfe des GCG-Programmes (Gene-  
15 tics Computer Group) durchgeführt. Die Bestimmung beruht auf einer Abwägung der Parameter Hydrophilität (Kyte-Doolittle), Sekundärstruktur (Chou-Fasman), Oberflächenlokalisierung (Robson-Garnier) und Flexibilität, wodurch die Antigenität von Teilpeptiden errechnet wird.

Das Prinzip der T-Zellepitop-Voraussage erfolgte im Prinzip nach dem Algo-  
20 rithmus von Margalit et al. (1987). Das Prinzip besteht in der Suche nach amphipatischen Helices laut Primärsequenz des zu bestimmenden Proteins, flankiert von hydrophilen Bereichen. Der berechnete Score muß für relevante T-Zellepitope größer als 10 sein. Bei MHC II assoziierten Peptiden kann kein Konsensus, weder der Sequenz noch der Länge des Peptids nach, wie bei HLA-A2 (human leucocyte anti-  
25 gen) (MHC I) assoziierten Peptiden definiert werden. Bei HLA-A2 assoziierten Peptiden beträgt die Länge des Peptids 10 Aminosäuren, wobei die 2. Aminosäure ein Tyrosin und die letzte Aminosäure ein Leucin darstellt (Rammensee et al. 1993). Die berechneten Epitope werden bei der Beschreibung der einzelnen allergenen Sequenzen getrennt angeführt.

30

#### 4. Molekulare Charakterisierung der klonierten Pilzallergene

Im folgenden Kapitel werden nun die cDNA Sequenzen und die mit ihnen durchgeführten Analysen der Reihe nach angeführt. Die Computerauswertung der nachfolgenden Sequenzen wurden auf einer Ultrix-DEC 5000 Workstation unter 5 Zuhilfenahme des GCG-Softwarepaketes (=Wisconsin Paket: die Algorithmen dieses Paketes wurden von der "University of Wisconsin" entwickelt) durchgeführt.

##### A: Clah12

Die folgende Sequenz 1 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz von Clah12 und 10 der von ihr abgeleiteten Aminosäuresequenz. Der offene Leserahmen umfaßt 333bp bzw. 111 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 11013 Dalton und entspricht somit dem 11kD großen allergenen Protein, das im Westernblot von 22% der Patienten erkannt wird.

15 Sequenz 1: Clah12 11013 Dalton

##### (I) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 333 Basenpaare / 111 Aminosäurereste
- (B) ART: Nukleinsäure / Protein
- 20 (C) STRANGFORM: ds
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA / Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTISENSE: nein
- (v) ART DES FRAGMENTS: Gesamtsequenz
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- 25 (A) ORGANISMUS: *Cladosporium herbarum*
- (C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

DNA sequence	333 b.p.	ATGTCTGCCGCC ... CTCTCGACTAA	linear
1 / 1		31 / 11	
ATG TCT GCC GCC GAG CTC GCT TCC TCC TAC GCC GCT CTC ATC CTG GCC GAT GAG GGT CTC			
Met Ser Ala Ala Glu Leu Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Leu Ile Leu Ala Asp Glu Gly Leu			
61 / 21		91 / 31	
GAG ATC ACT GCC GAC AAG CTC CAG GCT CTC ATC TCC GCC GCC AAG GTT CCT GAG ATC GAG			
Glu Ile Thr Ala Asp Lys Leu Gln Ala Leu Ile Ser Ala Ala Lys Val Pro Glu Ile Glu			
121 / 41		151 / 51	
CCC ATC TGG ACC TCT CTC TTC GCC AAG GCT CTC GAG GGC AAG GAC GTC AAG GAC CTC CTC			

Pro Ile Trp Thr Ser Leu Phe Ala Lys Ala Leu Glu Gly Lys Asp Val Lys Asp Leu Leu  
 181 / 61 211 / 71  
 CTG AAC GTT GGC TCT GGT GGT GGT GCC GCC CCC GCC GGT GGT GCT GCC GCT GGT GGT  
 Leu Asn Val Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly  
 241 / 81 271 / 91  
 GCC GCT GCC GTC CTG GAC GCC CCC GCC GAG GAG AAG GCT GAG GAG GAG AAG GAG GAG TCC  
 Ala Ala Ala Val Leu Asp Ala Pro Ala Glu Glu Lys Ala Glu Glu Glu Lys Glu Glu Ser  
 301 / 101 331 / 111  
 5 GAC GAC GAC ATG GGC TTC GGT CTC TTC GAC  
 Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp

Homologiesuchen in der SWISSPROT-Proteindatenbank ergaben hier Homolo-  
 gien zu ribosomalen Proteinen. Die beste Übereinstimmung findet man mit dem  
 10 Protein P1 von *Sacharomyces cerevisiae*, das zu einer Gruppe von sauren ribosoma-  
 len Phosphoproteinen gehört. Das allergene Protein Clah12 ist nicht nur wegen  
 seiner Eigenschaft als Allergen von *Cladosporium herbarum* interessant. Ribosomale  
 Proteine, hier im speziellen die humanen ribosomalen Proteine P1 und P2, sind in der  
 Literatur als Autoantigene beschrieben worden (Francoeur et al. 1985, Rich et al.  
 15 1987, Hines et al. 1991). 20% der Patienten mit Lupus erythematosus besitzen Au-  
 toantikörper (anti-rRNP) gegen Komponenten der Ribosomen, im speziellen Autoan-  
 tikörper gegen die ribosomalen Proteine P0 (38kD), P1 (16kD) und P2 (15kD). Die  
 humanen Autoantikörper kreuzreagieren mit ähnlichen Proteinen, was heißt, daß  
 Epitope erkannt werden, die in der Evolution stark konserviert wurden. Die Basis  
 20 der immunologischen Kreuzreaktivität bildet die 17 Aminosäurereste lange car-  
 boxyterminale Region KEESEED(D/E)DMGFGLFD. Ob eine in der Kindheit und  
 Jugend erfolgte Sensibilisierung durch Clah12 mit einem im Erwachsenenalter auftre-  
 tenden Autoimmunkrankheit korreliert, bedarf einer genauen Prüfung. Applikatio-  
 nen von ribosomalen Proteinen konnten allerdings in Mäusen keine Autoimmun-  
 25 krankheit erzeugen (Hines et al. 1991). Andere ribosomale Proteine (Clah 11 und  
 Alta 11) wurden ebenfalls schon als Allergene identifiziert (Achatz et al. 1994).

Die gezeigten B-Zellepitope in der nächsten Sequenz 2 sind unter Berücksichti-  
 gung von Sekundärstruktur, Oberflächenlage, Hydrophilität, Flexibilität etc. berech-  
 net worden.

**Sequenz 2: Clah12: B-Zellepitope****5 (I) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2**

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: einzeln angeführt
- (B) ART.- Protein
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus
- 10 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT-
  - (A) ORGANISMUS: *Cladosporium herbarum*
  - (C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Leu Ala Asp Glu Gly Leu Glu Ile Thr Ala Asp (15-25)

Ala Leu Glu Gly Lys Asp Val Lys Asp (50-58)

- 15 Ala Pro Ala Glu Glu Lys Ala Glu Glu Glu Lys Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly (87-105)

**Sequenz 3: Predicted amphipathatic segments = T-Zellepitope**

Flags	Midpoints	Angles	Score	
20 -----	-----	-----	-----	
K	28:49	80:135	45.3	QALISAAKVPEIEPIWTSLFAK
P	81:86	90:110	11.0	AAAVLD

**(I) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3**

- 25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: einzeln angeführt
- (B) ART. Protein
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: *Cladosporium herbarum*
- 30 (C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Gln Ala Leu Ile Ser Ala Ala Lys Val Pro Glu Ile Glu Pro Ile Trp Thr Ser Leu Phe Ala  
Lys (28 - 49)

Ala Ala Ala Val Leu Asp (81-86)

5

Die T-Zellepitope errechnen sich aus den Aminosäurepositionen der Midpoints, die N-terminal von einem Lysin (K), C-terminal von einem Prolin (P) frankiert werden (=Flags). Es sind nur dann potentielle T-Zellepitope vorhanden, wenn der  
10 "Score-Index" größer als 10 ist.

#### A: Clah8

Die folgende Sequenz 4 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz von Clah8 und  
15 der von ihr abgeleiteten Aminosäuresequenz. Der offene Leserahmen umfaßt 222bp bzw. 74 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 8164 Dalton und entspricht somit dem 8kD großen allergenen Protein, das im Westernblot von 9% der Patienten erkannt wird.

20 Sequenz 4: Clah8 8164 Dalton

#### (I) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 222 Basenpaare / 74 Aminosäurereste
- 25 (B) ART.- Nukleinsäure / Protein
- (C) STRANGFORM: ds
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA / Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTISENSE: nein
- (v) ART DES FRAGMENTS: Gesamtsequenz
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- 30 (A) ORGANISMUS: *Cladosporium herbarum*
- (C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

DNA sequence 222 b.p. ATGGACGCC7CC ... TTCCGCAACAAC linear

```

1   /   1                               31  /   11
ATG GAC GCC TCC ACC GAA CGC CAG AAC GGC ACC GTC AAG TGG TTC AAC GAC GAG AAG GGA
Met Asp Ala Ser Thr Glu Arg Gln Asn Gly Thr Val Lys Trp Phe Asn Asp Glu Lys Gly
61  /   21                               91  /   31
TAC GGC TTC ATC ACC CCC GAG AAC GGC TCC GCT GAC CTC TTG TTC CAC TTC CTC GCC ATT
5 Tyr Gly Phe Ile Thr Pro Glu Asn Gly Ser Ala Asp Leu Leu Phe His Phe Leu Ala Ile
121 /   41                               151 /   51
GAG AAG GAC GGC TTC AAG TCC CTC AAG GAG GGT GAG GCT GTC ACC TTC TTC GCC GAG CAG
Glu Lys Asp Gly Phe Lys Ser Leu Lys Glu Gly Glu Ala Val Thr Phe Phe Ala Glu Gln
181 /   61                               211 /   71
GGC CAG AAG GGC ATG CAG GCC TCC AGC TTC CGC AAC AAC
Gly Gln Lys Gly Met Gln Ala Ser Ser Phe Arg Asn Asn

```

- 10 Homologiesuchen in der SWISS-PROT Proteindatenbank ergaben eine signifi-  
kante Homologie (55% Identität) zu einer Familie von DNA-bindenden Proteinen.  
Das zentrale Motiv, das für diese Gruppe charakteristisch ist, bezeichnet man als  
cold-shock Domäne. Sie ist über das gesamte Organismenreich von den Bakterien  
bis zum Menschen konserviert. In Prokaryonten ermöglichen solche Proteine in  
15 ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren eine Anpassung der Zelle an einen Kälte-  
Schock. In Eukaryonten kennt man sie als Regulatoren der Transkription von Ge-  
nen, deren Promotoren ein Y-Box Motiv (CTGATTGGCCAA) enthalten. Aus die-  
sen Ergebnissen und der hohen Homologie zu Clah8 kann man auf eine mögliche  
Funktion dieses Allergens als Transkriptionsfaktor im Zusammenhang mit dem Käl-  
20 te-Schock schließen.

#### Sequenz 5: Clah8: B-Zellepitope

##### (I) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5

- 25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: einzeln angeführt  
(B) ART- Protein  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide  
(iii) HYPOTHETISCH: nein  
(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
30 (A) ORGANISMUS: *Cladosporium herbarum*  
(C) ENTWICKLUNGS STADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Gly Phe Ile Thr Pro Glu Asn Gly Ser (22-30)

Ile Glu Lys Asp Gly Phe Lys Ser Leu Lys Glu (40-50)

Phe Ala Glu Gln Gly Gln Lys Gly Met Gln (57-66)

5

### Sequenz 6: Predicted amphipathatic segments = T-Zellepitope

Flags	Midpoints	Angles	Score	
-----	-----	-----	-----	
10 K	44:51	95:135	18.1	GFKSLKEG
	62:67	80-135	9.6	QKGMQA

#### (I) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- 15 (A) LÄNGE: einzeln angeführt
- (B) ART. Protein
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: *Cladosporium herbarum*
- 20 (C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Gly Phe Lys Ser Leu Lys Glu Gly (44-51)

Gln Lys Gly Met Gln Ala (62-67)

- 25 Die T-Zellepitope errechnen sich aus den Aminosäurepositionen der Midpoints, die N-terminal von einem Lysin (K), C-terminal von einem Prolin (P) flankiert werden (=Flags). Es sind nur dann potentielle T-Zellepitope vorhanden, wenn der "Score-Index" größer als 10 ist.

30



## Literatur

- 5 Achatz, G., Oberkofler, H., Lechenauer, E., Simon, B., Unger, A., Kandler, D., Ebner, C., Prillinger, H., Kraft, D., Breitenbach, M. (1994).  
Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*.  
Mol. Immunol. in press.
- Birkner, T., Rumpold, H., Jarolim, E., Ebner, H., Breitenbach, M., Skarvil, F., Scheiner, O., Kraft, D. (1990).
- 10 Evaluation of immunotherapy-induces changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response.  
Allergy 45, 418.
- Bousquet, J., Becker, W.M., Hejjajoudi, A. (1991).  
Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with  
15 standardized extracts.  
J. Allergy Clin. Immunol. 88, 43.
- Francoeur, A.M., Peebles, C.L., Heckman, K.J., Lee, J.C., Tan, E.M. (1985).  
Identification of ribosomal protein autoantigens.  
J. Immunol. 135, 1767.
- Hines, J.J., Weissbach, H., Brot, N., Elkon, K. (1991).
- 20 Anti-P autoantibody production requires P1/P2 as immunogens but is not driven by exogenous self-antigen in mrl mice.  
J. Immunol. 146, 3386.
- Margalit, H., Spogue, J.L., Comette, J.L., Cease, K.B., Delisi, C., Berzofsky, J.A. (1987).  
Prediction of immunodominant Helper T cell antigenic sites from the primary sequence.  
J. Immunol. 138, 2213.
- 25 Rammensee, H.G., Falk, K., Rötzschke, O. (1993).  
MHC molecules as peptide receptors.  
Current Opinion in Immunol. 5, 35.
- Rich, B.E., Steitz, J.A. (1987).  
Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1 and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis and  
30 assembly.  
Mol. Cell. Biol. 7, 4065.

Rothbard, J.B., Geftter, M.L. (1991).  
Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins.  
Ann. Rev. Immunol. 9, 527.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5468

10

15

20

25

30

ERSATZBLATT (REGEL 26)

## Patentansprüche

1. Rekombinante DNA Moleküle, die für Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene Clah8 und Clah12 besitzen oder für Peptide, die mindestens ein Epitop dieser Allergene aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die mit den Sequenzen (1-6), oder mit Teilbereichen dieser Sequenzen in homologer Weise übereinstimmen, bzw. Nucleinsäuresequenzen, die mit den genannten Nucleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.
- 10 2. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die durch Degeneration aus den Sequenzen 1 bis 6 ableitbar sind.
3. Rekombinante DNA Moleküle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die für Polypeptide kodieren, 15 die als Antigene kreuzreaktiv mit den Allergenen Clah8 und Clah12 sind und zu diesen eine hohe Homologie aufweisen.
4. Rekombinante DNA-Moleküle nach Ansprüchen 1 bis 3. dadurch gekennzeichnet, daß sie funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz zu einem Expressionskonstrukt verbunden sind.
- 20 5. Wirtssysteme zur Expression von Polypeptiden, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt nach Anspruch 4 transformiert sind.
6. Aus einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 abgeleitetes rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, 25 daß es die Antigenität von Clah8 bzw. Clah12, oder zumindest von einem Epitop dieser Proteine aufweist.
7. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder ein Polypeptid nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die den gezeigten Sequenzen 1-6 zur Gänze oder teilweise entspricht.

30

8. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fusionsprodukt darstellt, das die Antigenität der Allergene Clah8 bzw. Clah12, oder zumindest eines Epitops davon aufweist und einen zusätzlichen Polypeptidanteil besitzt, wobei das gesamte 5 Fusionsprodukt von der DNA eines Expressionskonstrukts gemäß Anspruch 4 kodiert wird.

9. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der besagte zusätzliche Polypeptidanteil  $\beta$ -Galaktosidase oder ein anderes zur Fusion geeignetes Polypeptid ist.

10 10. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, dadurch gekennzeichnet, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9 enthält.

11. Verfahren zum in vitro-Nachweis der Allergie eines Patienten gegen die Allergene Clah8 und Clah12, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion der IgE 15 Antikörper im Serum des Patienten mit einem rekombinanten oder synthetischen Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 9 gemessen wird.

12. Verfahren zum in vitro-Nachweis der zellulären Reaktion auf die Allergene Clah8 und Clah12, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Stimulierung 20 oder Hemmung der zellulären Reaktion eingesetzt wird.

25

30